解淀粉芽孢杆菌 TF28 抗菌脂肽芬芥素的分离鉴定及抑菌作用[1]

刘宇帅[1,2]，张杰[3]，钟瑾[3]，李晶[1,2]，孟利强[1,2]，张淑梅[1,2*]

(1.黑龙江省科学院微生物研究所，黑龙江 哈尔滨 150010； 2.黑龙江省科学院高技术研究院，黑龙江 哈尔滨 150020；3.中国科学院微生物研究所，北京 100101)

摘要：对一株解淀粉芽孢杆菌 TF28 产生的抗菌脂肽进行分离鉴定及抑菌活性研究，采用酸沉淀、乙酸乙酯和甲醇萃取技术制备了抗菌脂肽粗提物，经过 2 次 HPLC 分离纯化，在保留时间 32-42min 内获得 8 个抗菌脂肽纯品，经 MALDI-TOF-MS 鉴定为芬芥素（fengycins），对尖孢镰刀菌和禾谷镰刀菌显示较强的抑菌活性，该研究为提高菌株 TF28 抗菌脂肽产量的定向遗传改造奠定基础。

关键词：解淀粉芽孢杆菌 尖孢镰刀菌 禾谷镰刀菌 抗菌脂肽 芬芥素

Isolation and Identification of Antibacterial Lipopeptides Fengycin Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* TF28 and its Anti-fungal Mechanism Studies

LIU Yu-shuai[1,2], ZHANG Jie[3], ZHONG Jin[3], LI Jing[1,2], MENG Li-qiang[1,2], ZHANG Shu-mei[1,2*]

(1. Institute of Microbiology of Heilongjiang Academy of Sciences, Heilongjiang Harbin 150010, China;
2. Institute of Advanced Technology, Heilongjiang Academy of Sciences, Heilongjiang Harbin 150020, China;
3. Institute of Microbiology Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: The antifungal lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* TF28 have been isolated and identified and their antifungal activity have been studied. The

[1] 基金项目：中国科学院微生物研究所微生物资源前期开发国家重点实验室开放课题（SKLMR-20150604），黑龙江省省院科技合作项目（YS16C15），黑龙江省科学院青年创新基金面上项目（CXMS2017SW01）
作者简介：刘宇帅，女，硕士，研究方向：植物病害生物防治，微生物分子遗传；E-mail: ttkqbzj@163.com
* 通讯作者：张淑梅，女，博士，研究方向：植物病害生物防治，微生物分子遗传；E-mail: 1401135157@qq.com

Fund Project: Open Project of State Key Laboratory of Microbial Resources The Institute of Microbiology Chinese Academy of Sciences (SKLMR-20150604), Science and Technology Cooperation Project of Heilongjiang Province and Academy (YS16C15), Project of Youth Innovation Fund of Heilongjiang Academy of Sciences (CXMS2017SW01)
About the Author: Liu Yushuai, female, master's degree, research direction: biocontrol of plant diseases, microbial molecular genetics; E-mail: ttkqbzj@163.com
* Corresponding author: Zhang Shumei, female, Ph.D., research direction: biocontrol of plant diseases, microbial molecular genetics; E-mail: 1401135157@qq.com

extract of antifungal lipopeptides was prepared by acid precipitation, ethyl acetate and methanol extraction. After two rounds of HPLC separation, eight antifungal lipopeptides were obtained within 32-42 min of retention time, and they have been identified as fengycins by MALDI-TOF-MS, which show strong antifungal activity against *Fusarium oxysporum* and *Fusarium graminearum*. These results will contribute to the directional genetic manipulation of the strain TF28 to improve the yield of antifungal lipopeptides.

Keywords: *Bacillus amyloliquefaciens*; *Fusarium oxysporum*; *Fusarium graminearum*; Antifungal Lipopeptides; Fengycin

解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* 在自然界中分布广泛，是一类重要的生防资源菌。因其能够分泌丰富的抗菌物质，备受国内外学者关注，目前对解淀粉芽孢杆菌抗菌物质的分离纯化及应用研究成为生防领域的研究热点[1-5]。

解淀粉芽孢杆菌能够分泌肽类、脂肽类以及蛋白类等多种抗菌活性物质，其种类与产量因菌株而异。已有研究表明解淀粉芽孢杆菌产生的脂肽类抗菌物质主要包括伊枯草菌素（Iturin）、芬芥素（Fengycin）和表面活性素（Surfactin），由多酶复合体通过非核糖体途径合成，同一种脂肽类抗菌物质一般具有 3-5 个同系物，不同的同系物在脂肪酸链的长度上有所差异[6]。由于这些物质结构多样，具有广谱抗菌活性，而且稳定性好，可参与多种生防过程，如拮抗病原菌、促进生防菌根际定殖和诱导植物系统抗性等，在植物病害生物防治中发挥重要作用[7-10]。

菌株 TF28 是从大豆根部分离出的一株内生细菌，具有广谱抗菌活性[11]。基因组测序发现该菌株包含 3 类脂肽类抗菌物质基因合成簇[12]，前期研究发现该菌株能够分泌 Iturin 脂肽类抗菌物质[13]，为了明确该菌株是否分泌其它脂肽类抗菌物质，为菌株应用及遗传改造奠定基础，本研究针对芬芥素进行了分离纯化及抑菌功能的研究。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* TF28 由黑龙江省科学院微生物研究所从大豆根部分离获得，用 LB 培养基活化备用。尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum*（保藏编号：HWS04）和禾谷镰刀菌 *Fusarium graminearum*（保藏编号：HWS07）由黑龙江省生物工程重点实验室保存，用 PDA 培养基繁殖、保存、备用。

1.2 抗菌脂肽的提取

采用盐酸沉淀方法提取抗菌脂肽粗提物。接种一环活化的 TF28 菌株于 3 mL LB 液体培养基中，30℃、200 r/min 培养 16h，然后以 2%接种量转接到 200 mL 抗菌脂肽优化培养基中[14]（葡萄糖 42. 37 g/L，酵母膏 2 g/L，牛肉膏 2 g/L，硫酸铵 2 g/L，硫酸镁 2. 11 g/L，氯化钙 0. 1 g/L，硫酸锰 0. 1 g/L，磷酸二氢钾 1. 5 g/L，磷酸氢二钠 3 g/L），30℃、200 r/min 培养 48h， 4℃、8000 r/min 离心 20min，收集上清液，用 5mol/L 的 HCl 调节 pH 值至 2.0-2.5，4℃静置过夜，8000 r/min 离心 20min，收集沉淀，自然干燥，用甲醇抽提 1 次，用乙酸乙酯和水混合萃取，

自然挥发干燥后，用甲醇溶解得到抗菌脂肽粗提物。

1.3 抗菌脂肽芬芥素的分离纯化

将抗菌脂肽粗提物用Φ=0.22μm 滤膜过滤，利用岛津高效液相色谱仪，用 C18 反相柱分离纯化抗菌脂肽芬芥素。以水/TFA 为流动相 A，以甲醇/TFA 为流动相 B，按照 B 的浓度在 10min 内从 30%升高到 70%，然后在 25min 内最终升高到 100%的洗脱梯度进行分离纯化。手动收集 HPLC 各组份，用离心旋转蒸发仪浓缩后进行抑菌活性测定，对具有抑菌活性的组份进行第二次分离纯化，收集各组份，再进行抑菌活性测定。

1.4 抗菌脂肽抑菌活性测定

采用纸片抑菌圈法检测抗菌脂肽粗提物及 HPLC 纯化物对尖孢镰刀菌和禾谷镰刀菌的抑菌活性。在直径 90mm 的 PDA 培养基平板的中心接种病原菌块（直径 8mm），距离病菌 2cm 处等距离放入灭菌滤纸片，滴加 10μL 样品，以溶剂作对照，28℃培养 3~5d，观察抑菌活性。

1.5 抗菌脂肽的质谱分析

利用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)对抑菌活性组分进行分析鉴定，CHCA（α-氰基-4-羟基肉桂酸）基质溶解在含 0.1% TFA(三氟乙酸)的 30%乙腈水溶液中，采用正离子反射模式获得谱图。结合文献报道的芽胞杆菌脂肽类抗生素的分子量及相关信息，对 TF28 菌株中的抑菌活性物质进行鉴定。

2 结果与分析

2.1 抗菌脂肽粗提物的抑菌作用

以尖孢镰刀菌和禾谷镰刀菌为指示菌检测脂肽粗提物的抑菌活性，结果如图 1 所示，脂肽粗提物能够抑制两种病原真菌的生长，对尖孢镰刀菌的抑菌活性较强。

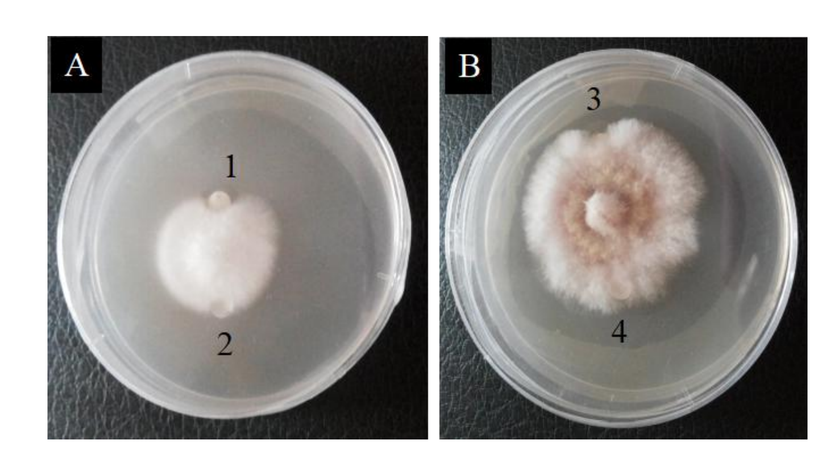


图 1 菌株 TF28 脂肽粗提物对病原真菌的抑菌作用

A：对尖孢镰刀菌的抑菌作用 B：对禾谷镰刀菌的抑菌作用

1 、3：脂肽粗提物 (Lipopeptide extract)；2、4：对照 (Control)

Figure 1. Antifungal activity of lipopeptide extract produced by strain TF28 to pathogenic fungi

A: The antifungal activity to *Fusarium oxysporum*

B: The antifungal activity to *Fusarium graminearum*

2.2 抗菌脂肽的分离纯化

脂肽粗提物经第一次 HPLC 分离纯化，60min 之内出现多个峰，共收集 11 个组份峰（图 2），以尖孢镰刀菌为指示菌测定抑菌活性，有 3 个组份（1-5、1-6 和 1-7）表现出明显的抑菌效果（图 3），出峰时间在 32-42min 内；分别将 3 个组份再进行第二次纯化，1-5 和 1-6 两组份经过第二次纯化均可收集到单一主峰，分别为 2-1 和 2-2，1-7 组份经过第二次纯化收集到多个组份峰（2-3、2-4、2-5、2-6、2-7 和 2-8）（图 4），收集各组份峰，进行抑菌活性测定，结果表明各组份均能抑制尖孢镰刀菌和禾谷镰刀菌生长，其中组份 2-1、2-2、2-3、2-4、2-5 和 2-6 对两种病原真菌的抑菌活性均较强，组份 2-8 对禾谷镰刀菌的抑菌活性较强，但对尖孢镰刀菌的抑菌活性较弱，而组份 2-7 对两种病原真菌的抑菌活性都相对较低（图 5）。

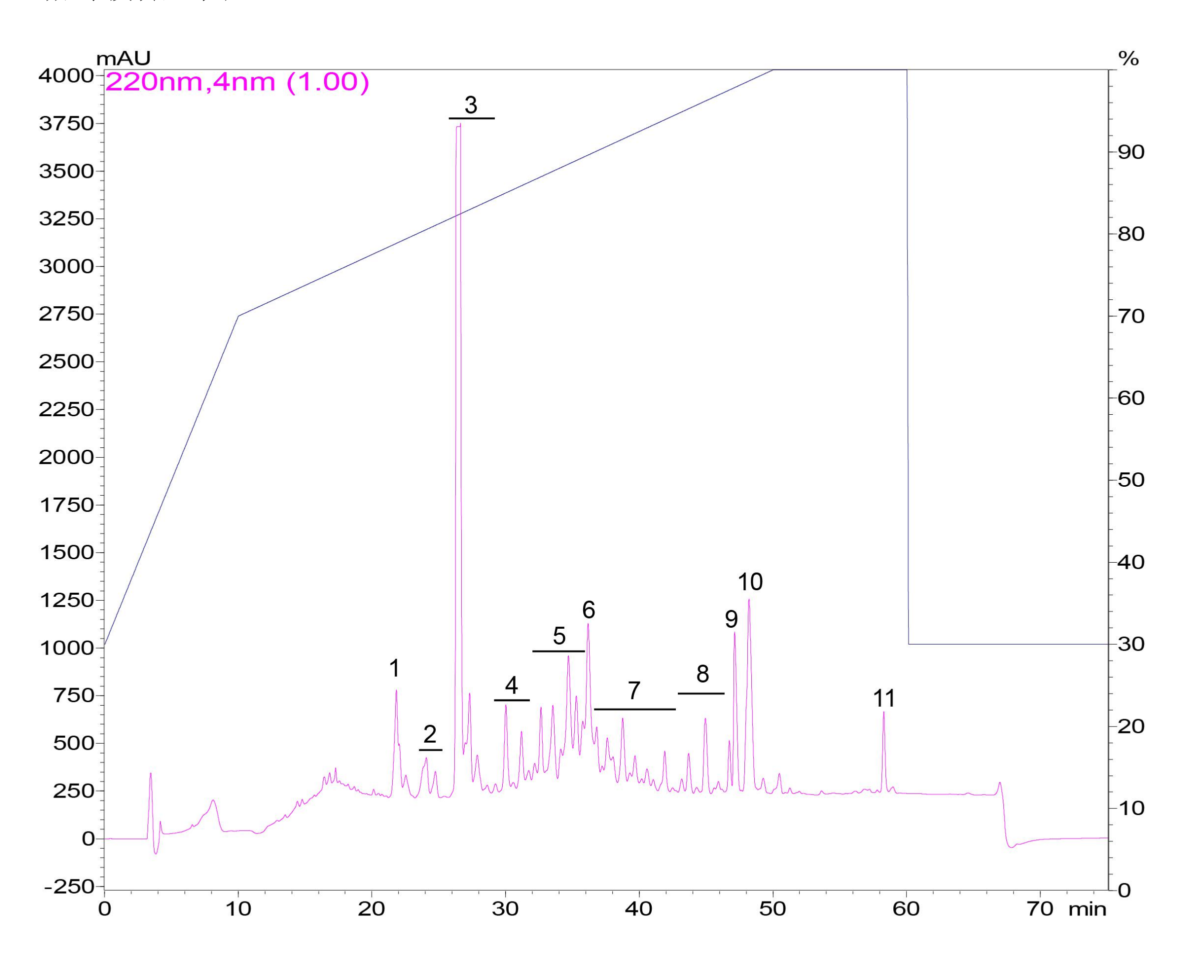


图 2　菌株 TF28 脂肽粗提物的 HPLC 分析

1-11 为收集的各组份峰

Figure 2. Analysis of the lipopeptide extract produced by strain TF28 by HPLC

1-11：constituents 1-11

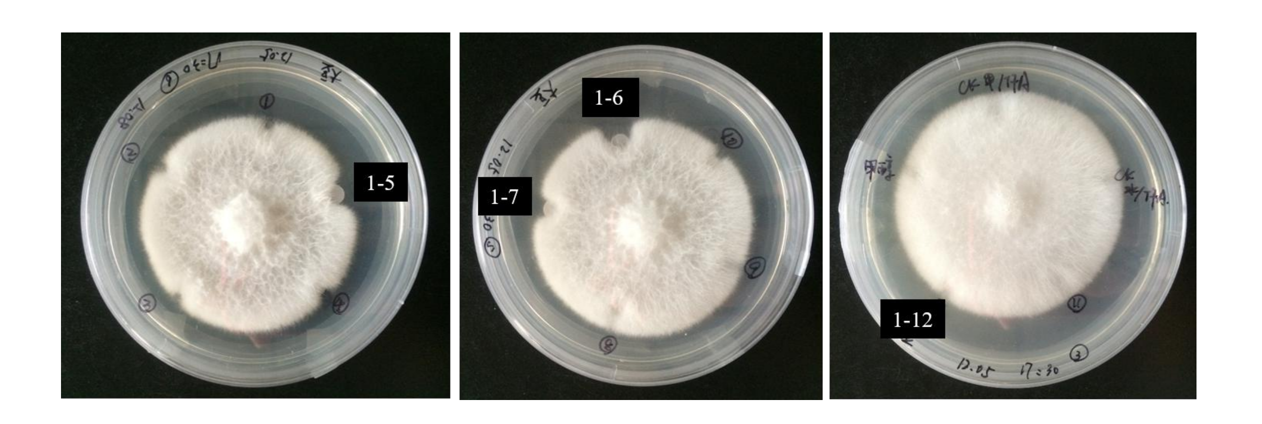


图 3　HPLC 第一次分离纯化部分组份对尖孢镰刀菌的抑菌效果

1-5、1-6、1-7：抑菌活性组份（Antibacterial active constituents）；1-12：对照（Control)

Figure 3. Antifungal activity of first HPLC separation constituents to *Fusarium oxysporum*

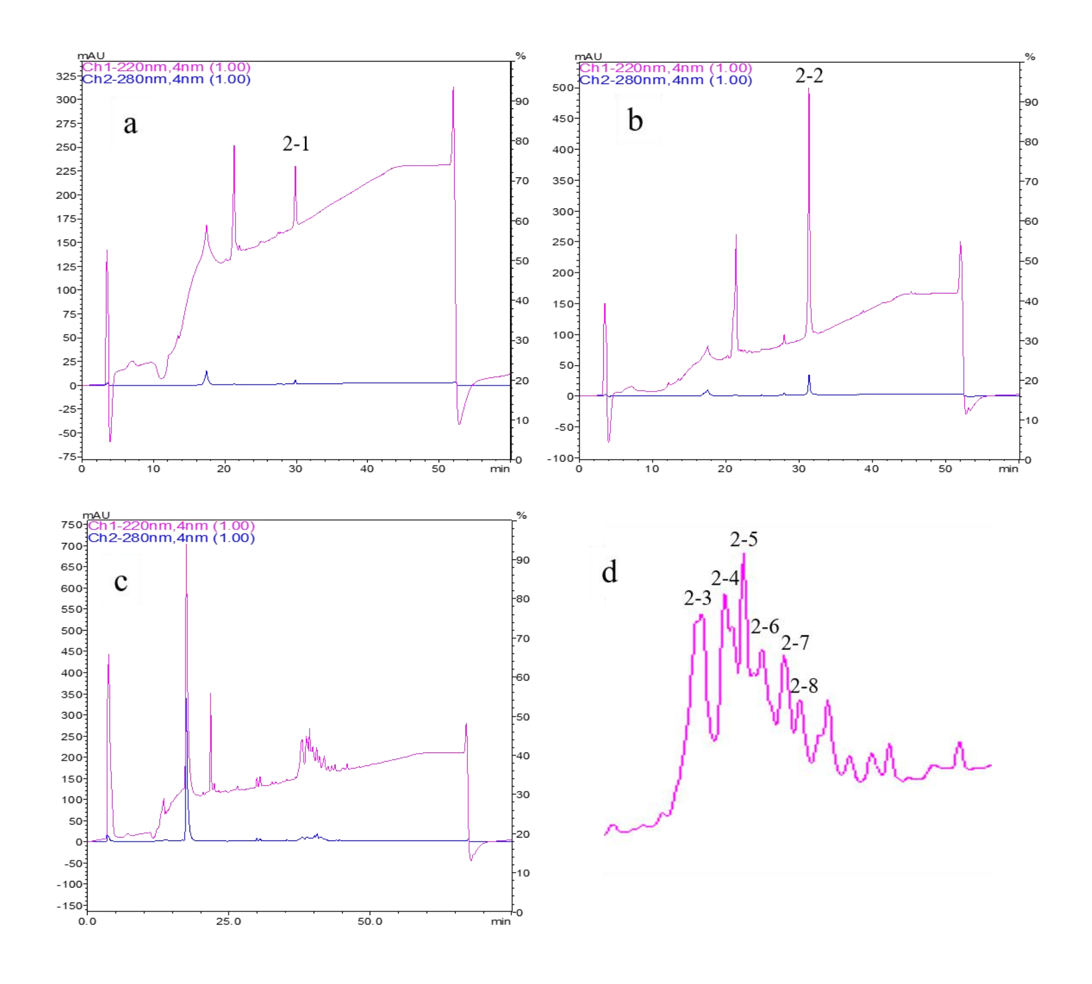


图 4　3 个活性组份第二次 HPLC 分离纯化结果

a：组份 1-5；b：组份 1-6；c：组份 1-7；d：组份 1-7 主峰放大图

Figure 4. Analysis of the second HPLC separation of three active constituents

a: Constituent 1-5; b: Constituent 1-6; c: Constituent 1-7; d: Magnification of the main peaks for constituent 1-7

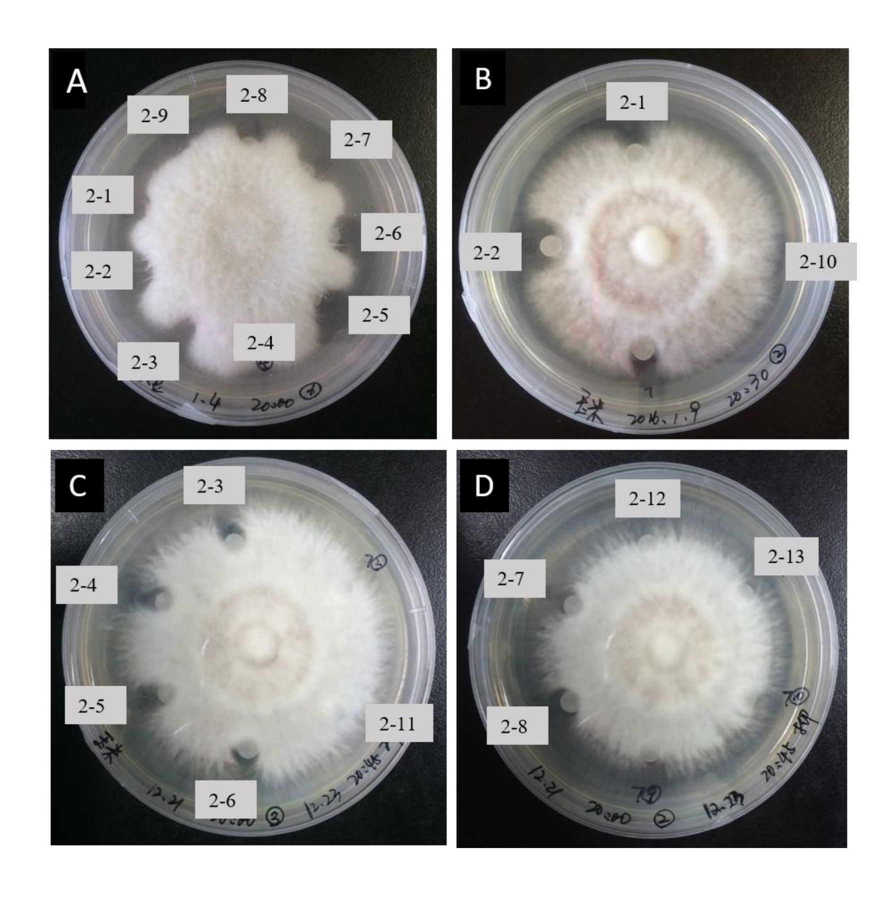


图 5　第二次分离纯化各组份的抑菌活性

A：对尖孢镰刀菌的抑菌活性；B-D：对禾谷镰刀菌的抑菌活性

2-1~2-8：第二次分离纯化后收集的各组份；2-9~2-13：对照

Figure 5. Antifungal activity of each constituent from the second HPLC separation

A: The antifungal activity to *Fusarium oxysporum*

B-D: The antifungal activity to *Fusarium graminearum*

2-1~2-8: Each active constituent ; 2-9~2-13: Control

2.3 抗菌脂肽的基质辅助激光解吸飞行时间质谱（MALDI-TOF-MS）分析

采用 MALDI-TOF-MS 对第二次纯化后有抑菌活性的 8 个组份纯品进行分析：一级质谱显示为组份 2-1、2-2、2-3、2-5、2-7（$[M+H]^+$ 1463.7832、1491.8247、1505.8154、1491.7981、1519.8358）属于第 1 组同系物，组份 2-4、2-6 和 2-8（$[M+H]^+$ 1447.7803、1475.8151、1489.8183）属于第 2 组同系物（图 6 A-H，表 1）。第 1 组同系物相对分子质量依次相差 14，即恰好一个 CH2，推测其脂肪酸链上差一个亚甲基，或者是肽链第 6 位上 Ala 被 Val 替代所致，该物质与已报道的脂肽类化合物芬芥素的相对分子质量一致[15]。据报道，芬芥素的分子结构一般由一条β-羟基脂肪酸和一个成环十肽两部分组成[16]，分为 fengycins A 和 fengycins B 两种类型，当肽链第 6 位上的氨基酸是 Ala 时，属于 fengycins A，而当肽链第 6 位上的氨基酸是 Val 时则属于 fengycins B[17]。目前，关于芬芥素化合物的鉴定主要是依据其质谱分子峰及特征离子峰[17]。进一步用二级质谱分析上述第 1 组同系物中具有 5 种相对分子质量的肽片段，分别获得了相应肽片段的二级质谱图：组分 2-1 和 2-5 的特征离子峰为 966 和 1 080(图 7 I 和 M，表 1），这与 fengycins

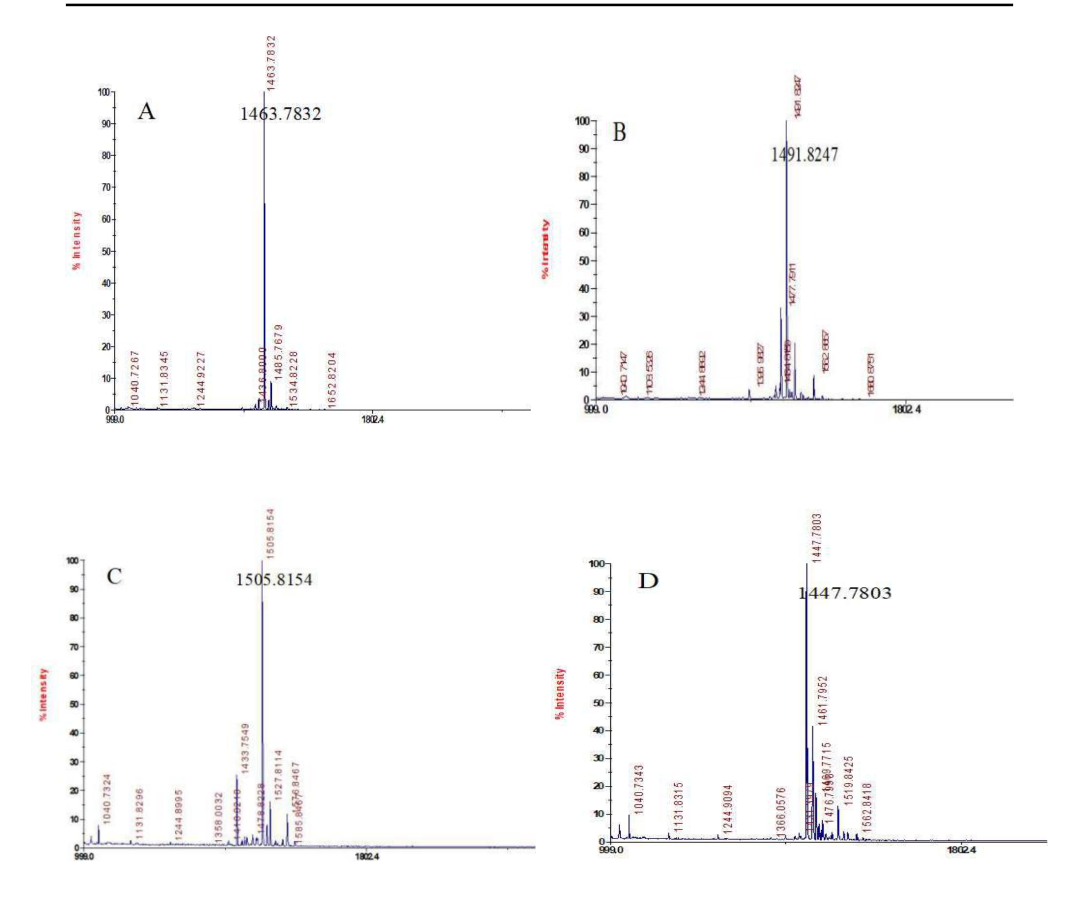
A 的特征离子峰一致[17];组份 2-2、2-3 和 2-7 的特征离子峰分别为 994 和 1108(图 7 J、K 和 O，表 1) ，这与 fengycins B 的特征峰一致[17]。

第 2 组同系物 (［M +H］$^+$1447.7803、1475.8151、1489.8183) 的相对分子质量同样相差 14，二级质谱分析肽片段：组份 2-4 的特征离子峰为 966 和 1 080(图 7 L，表 1)，与 fengycins A 的特征离子峰一致[17]；组份 2-6 和 2-8 的特征离子峰为 994 和 1108(图 7 N 和 P，表 1) ，这与 fengycins B 的特征峰一致[17]。因此经过第二次纯化后得到有抑菌活性的 8 个组份纯品属于一类物质，即脂肽类抗生素芬芥素（Fengycins）。

表 1 抗菌脂肽 MALDI-TOF-MS 的结果与分析

Table 1 Results of MALDI-TOF spectrum of 8 active constituents

序号 Constituents	相对分子量 ［M +H］$^+$	特征离子峰 1 Characteristic ion peak 1	特征离子峰 2 Characteristic ion peak 2
2-1	1463.7832	966	1080
2-2	1491.8247	994	1108
2-3	1505.8154	994	1108
2-4	1447.7803	966	1080
2-5	1491.7981	966	1080
2-6	1475.8151	994	1108
2-7	1519.8358	994	1108
2-8	1489.8183	994	1108



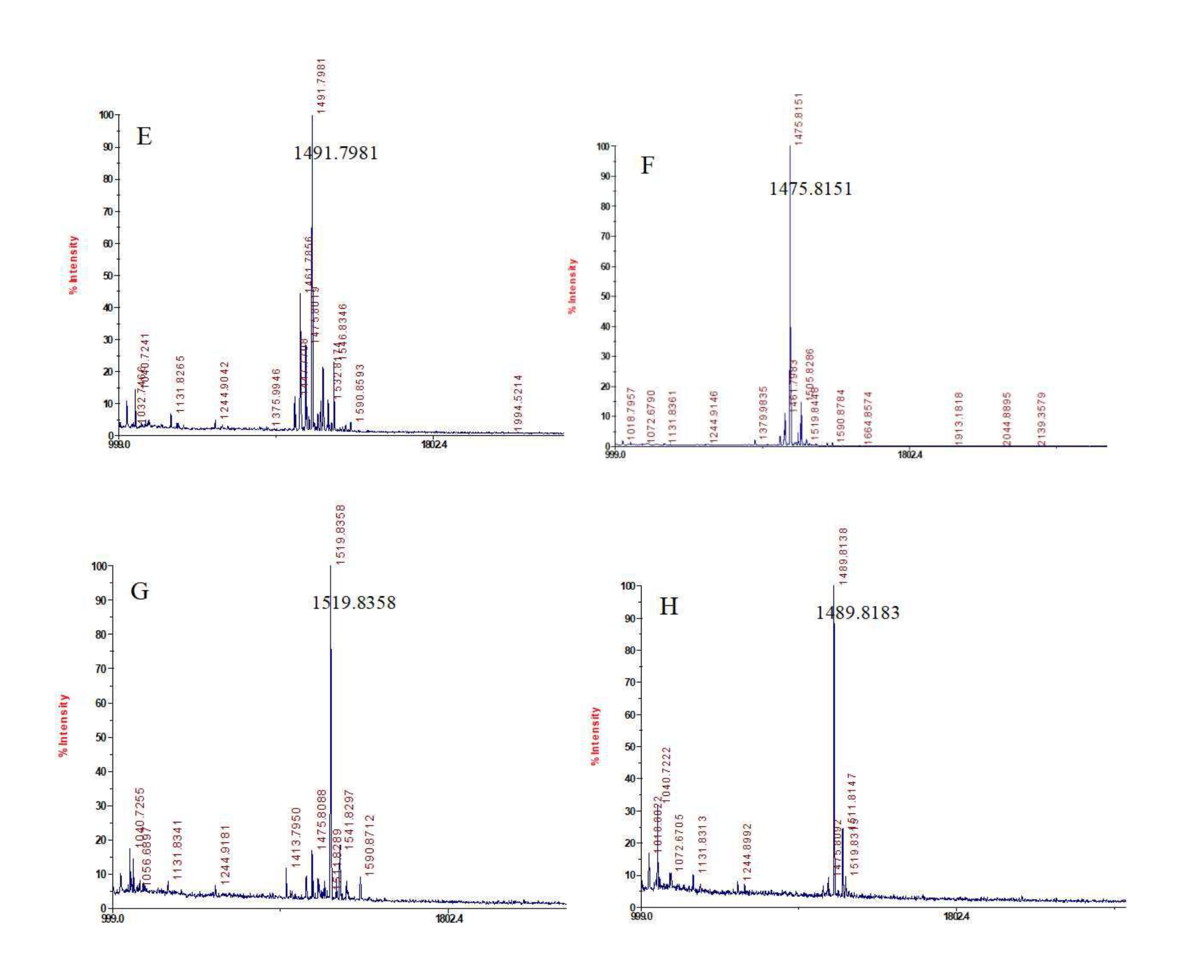
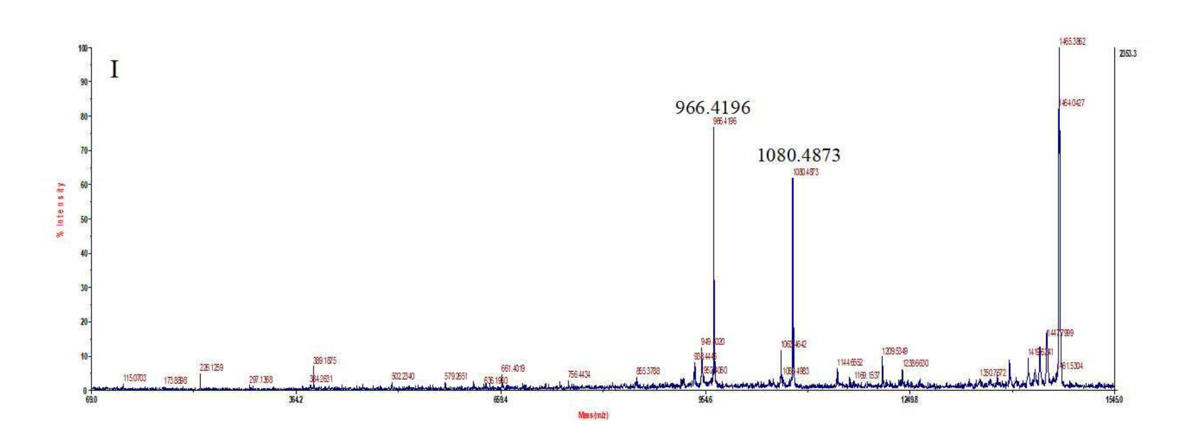


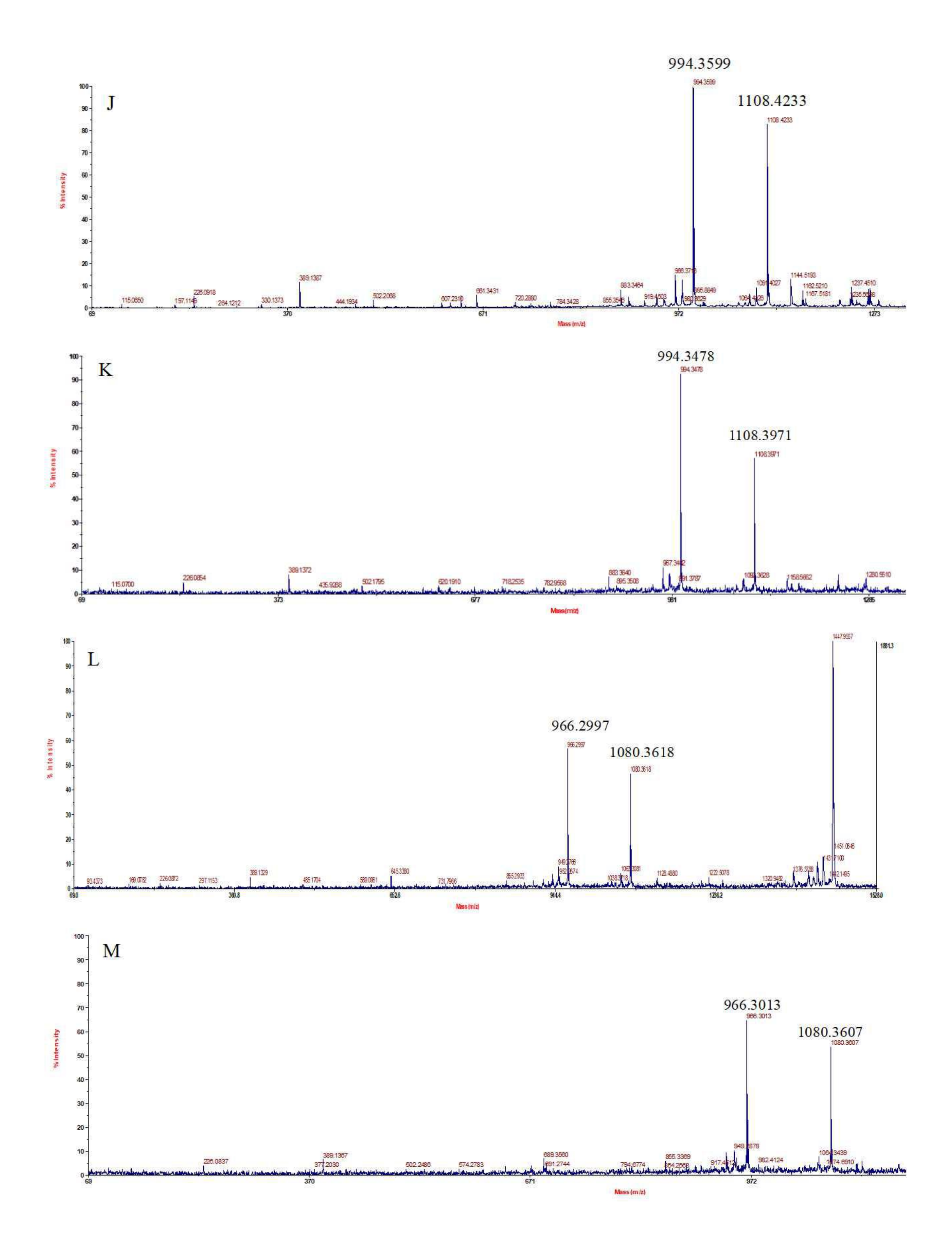
图 6 菌株 TF28 的 8 个活性组分 MALDI-TOF-MS 的一级质谱图

A-H：组份 2-1~2-8 的质谱分子峰

Figure 6. MALDI-TOF spectrum of 8 active constituents of strain TF28

A-H: ［M +H］$^+$ of constituents 2-1~2-8




994.3599
J
1108.4233
% Intensity
Mass (m/z)
994.3478
K
1108.3971
966.2997
L
1080.3618
966.3013
M
1080.3607

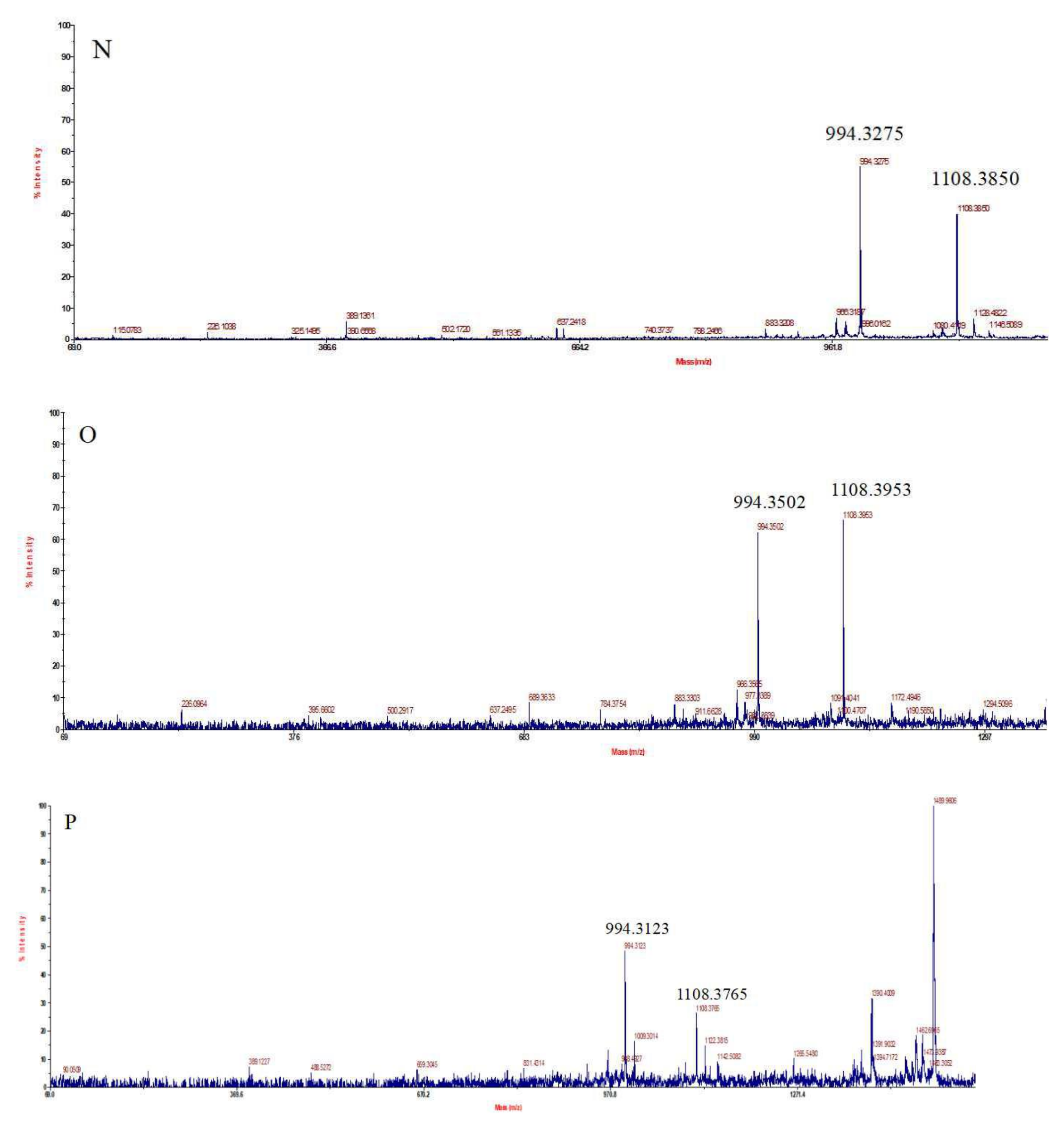


图 7　菌株 TF28 的 8 个活性组分 MALDI-TOF-MS 的二级质谱图

I-P：组份 2-1~2-8 的特征离子峰

Figure 7. MALDI-TOF /TOF spectrum of procured ions of 8 active constituents of strain TF28

I-P: Characteristic ion peaks of constituents 2-1~2-8

3 讨论

脂肽类抗菌物质对细菌、真菌、肿瘤和病毒等微生物具有广谱抗性，结构稳定，不易产生耐药性，是抗生素理想替代品之一，在农业和医学方面应用潜力较大。芽孢杆菌是一类产生抗菌脂肽的重要微生物资源，目前对于芽孢杆菌抗菌脂肽的报道较多，主要集中在抗菌脂肽的分离纯化及抑菌活性方面，因产量较低，未在农业方面得到应用。抗菌脂肽的种类与抑菌活性因菌株而异，李宝庆等[18]从枯草芽孢杆菌 BAB-1 中分离出 surfactin 和 fengycin，fengycin 抑制番茄灰霉病菌生长；姬婧媛等[19]从枯草芽孢杆菌 E1R-j 中分离纯化出 fengycin，抑制小麦全蚀病菌生长。本研究从菌株 TF28 中分离纯化出 8 种 fengycins A 和 B 同系物，

抑制尖孢镰刀菌和禾谷镰刀菌生长。由于不同菌株产生芬芥素同系物的结构不同，其抑菌谱也不同，本研究获得芬芥素的抑菌谱与文献报道不同，推测其在结构方面与文献报道有差异。

芬芥素能够作用于病原菌细胞壁的类脂层，破坏细胞膜的结构和透性，从而对多种植物病原真菌，尤其是丝状真菌具有较强的抑制作用。有研究表明，不同抗菌脂肽具有协同增效抑菌作用。iturins 和 fengycins 对植物病原真菌具有较强抑制作用[20, 21]，surfactin 自身没有明显抑菌活性，但其可增强 iturins 或 fengycins 的抑菌活性[22, 23]，此外，surfactin 和 fengycins 还具有诱导抗病性作用(ISR)[24, 25]。

菌株 TF28 的基因组中存在编码 3 类抗菌脂肽的基因簇[12]，前期已分离纯化出 iturinA，抑制水稻恶苗病菌生长[13]，本研究采用非等浓度洗脱梯度的 HPLC 方法，分离纯化出 8 种芬芥素同系物，说明该菌株产生芬芥素同系物种类丰富，但产量较低，达不到应用要求，后续将依托本研究结果针对提高抗菌脂肽的产量进行菌株 TF28 遗传改造研究，以期获得高产抗菌脂肽菌株，为抗菌脂肽的应用提供菌株资源。

参考文献

1. 车晓曦, 李社增, 李校堃, 等. 1 株解淀粉芽孢杆菌发酵培养基的设计及发酵条件的优化. 安徽农业科学, 2010, 38(18): 9402-9405.
Che X X, Li S Z, Li X K, et al. Research on the design of the medium for the Amyloliquefaciens bacillus fermentation and optimization of its fermentation condition. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2010, 38(18): 9402-9405.
2. 郝建安, 曹志辉, 赵凤梅, 等. 解淀粉芽孢杆菌 NK10.BAhjaWT 抑真菌作用的研究. 微生物学通报, 2008, 35(6): 903-908.
Hao J A, Cao Z H, Zhao F M, et al. Exploring the antifungal activity of Bacillus amyloliquefaciens NK10.BAhjaWT. Microbiology China, 2008, 35(6): 903-908.
3. Niazi A, Manzoor S, Bejai S, et al. Complete genome sequence of a plant associated bacterium Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum UCMB5033. Stand Genomic Sci, 2014, 9(3): 718-725.
4. 吴一晶, 林艺芬, 林河通, 等. 生防菌解淀粉芽孢杆菌研究进展. 包装与食品机械, 2012, 30(6) : 49-52.
Wu Y J, Lin Y F, Lin H T, et al. Advances in the researches of biocontrol bacteria Bacillus amyloliquefaciens. Packaging and Food Machinery, 2012, 30(6) : 49-52.
5. 张龙来, 康向辉, 魏孝义, 等. 1 株解淀粉芽孢杆菌 HN011 抑菌次级代谢产物的分析. 华南农业大学学报, 2016, 37(1) : 63-69.
Zhang L L, Kang X H, Wei X Y, et al. Research on secondary metabolites from Bacillus amyloliquefaciens strain HN011. Journal of South China Agricultural University, 2016, 37(1) : 63-69.
6. Stein T. Bacillus subtilis antibiotics: structures, syntheses and specific functions. Mol Microbiol, 2005, 56(4): 845-857.
7. Montesinos E. Antimicrobial peptides and plant disease control. FEMS Microbiol Lett, 2007, 270(1): 1-11.
8. 汪静杰, 赵东洋, 刘永贵, 等. 解淀粉芽孢杆菌 SWB16 菌株脂肽类代谢产物对球孢白僵

菌的拮抗作用. 微生物学报, 2014, 54(7) : 778-785.
Wang J J, Zhao D Y, Liu Y G, et al. Antagonism against Beauveria bassiana by lipopeptide metabolites produced by entophyte Bacillus amyloliquefaciens strain SWB16. Acta Microbiologica Sinica, 2014, 54(7) : 778-785.
9. Ongena M, Jacques P. Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends Microbiol, 2008, 16(3): 115-125.
10. Alvarez F, Castro M, Principe A, et al. The plant-associated Bacillus amyloliquefaciens strains MEP2 18 and ARP2 3 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of sclerotinia stem rot disease. J Appl Microbiol, 2012, 112(1): 159-174.
11. 张淑梅, 沙长青, 王玉霞, 等. 大豆内生细菌的分离及根腐病拮抗菌的筛选鉴定（英文）. 微生物学通报, 2008(10): 1593-1599.
Zhang S M, Sha C Q, Wang Y X, et al. Isolation and characterization of antifungal endophytic bacteria from soybean. Microbiology China, 2008(10): 1593-1599.
12. Zhang S, Jiang W, Li J, et al. Whole genome shotgun sequence of Bacillus amyloliquefaciens TF28, a biocontrol entophytic bacterium. Stand Genomic Sci, 2016, 11: 73.
13. Zhang S, Wang Y, Meng L, et al. Isolation and characterization of antifungal lipopeptides produced by endophytic Bacillus amyloliquefaciens TF28. African Journal of Microbiology Research, 2012, 6(8) : 1747-1755.
14. 刘宇帅, 孟利强, 陈静宇, 等. 解淀粉芽胞杆菌 TF28 产抗菌脂肽培养基优化. 微生物学杂志, 2017, 37(3) : 52-58.
Liu Y S, Meng L Q, Chen J Y, et al. Optimization of medium for the production of antifungal lipopeptides by Bacillus amyloliquefaciens TF28. Journal of microbiology, 2017, 37(3) : 52-58.
15. Vater J, Kablitz B, Wilde C, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization--time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of Bacillus subtilis C-1 isolated from petroleum sludge. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(12): 6210-6219.
16. de Faria AF, Stefani D, Vaz BG, et al. Purification and structural characterization of fengycin homologues produced by Bacillus subtilis LSFM-05 grown on raw glycerol. J Ind Microbiol Biotechnol, 2011, 38(7): 863-871.
17. Wang J, Liu J, Wang X, et al. Application of electrospray ionization mass spectrometry in rapid typing of fengycin homologues produced by Bacillus subtilis. Lett Appl Microbiol, 2004, 39(1): 98-102.
18. 李宝庆, 鹿秀云, 郭庆港, 等. 枯草芽孢杆菌 BAB-1 产脂肽类及挥发性物质的分离和鉴定. 中国农业科学, 2010, 43(17): 3547-3554.
Li B Q, Lu X Y, Guo Q G, et al. Isolation and identification of lipopeptides and volatile compounds produced by Bacillus subtilis strain BAB-1, Scientia Agricultura Sinica, 2010, 43(17): 3547-3554.
19. 姬婧媛, 杨洁, 高小宁, 等. 植物内生枯草芽孢杆菌 E1R-j 脂肽类化合物的分离鉴定及抑菌作用. 农药学学报, 2015, 17(02): 172-178.
Ji J Y, Yang J, Gao X N, et al. Isolation and identification of lipopeptides produced by endophytic bacteria Bacillus subtilis E1 R -j and its anti-fungal mechanism studies, Chinese Journal of Pesticide Science, 2015, 17(02): 172-178.
20. Deleu M, Paquot M, Nylander T. Effect of fengycin, a lipopeptide produced by Bacillus subtilis, on model biomembranes. Biophys J, 2008, 94(7): 2667-2679.
21. Arrebola E, Jacobs R, Korsten L. Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of

Bacillus amyloliquefaciens PPCB004 against postharvest fungal pathogens. J Appl Microbiol 2010, 108(2): 386-395.
22. Maget-Dana R, Thimon L, Peypoux F, et al. Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. Biochimie, 1992, 74(12): 1047-1051.
23. Tao Y, Bie XM, Lv FX, et al. Antifungal activity and mechanism of fengycin in the presence and absence of commercial surfactin against Rhizopus stolonifer. J Microbiol, 2011, 49(1): 146-150.
24. Ongena M, Duby F, Jourdan E, et al. Bacillus subtilis M4 decreases plant susceptibility towards fungal pathogens by increasing host resistance associated with differential gene expression. Appl Microbiol Biotechnol, 2005, 67(5): 692-698.
25. Ongena M, Jourdan E, Adam A, et al. Surfactin and fengycin lipopeptides of Bacillus subtilis as elicitors of induced systemic resistance in plants. Environ Microbiol, 2007, 9(4): 1084-1090.